

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Васюченко Екатерина Павловна

**Исследование молекулярных механизмов антимикробного действия
метиленового синего методами компьютерного моделирования**

1.5.2. Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2025

Диссертация подготовлена на кафедре биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Научные руководители

— Коваленко Илья Борисович, доктор физико-математических наук

Страховская Марина Глебовна, доктор биологических наук

Официальные оппоненты

— Ларичев Виктор Филиппович, доктор медицинских наук, ФГБУ "Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи" Министерства здравоохранения Российской Федерации, Лаборатория биологии и индикации арбовирусов, ведущий научный сотрудник

Холмуродов Холмирзо Тагойкулович, доктор физико-математических наук, Международная межправительственная научно-исследовательская организация «Объединенный институт ядерных исследований», Лаборатория нейтронной физики имени И.М. Франка, ведущий научный сотрудник

Чемерис Николай Константинович, доктор биологических наук, профессор, Институт биофизики клетки Российской академии наук — обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Лаборатория механизмов регуляции биосистем, главный научный сотрудник

Защита диссертации состоится 4 декабря 2025 г. в 16-00 на заседании диссертационного совета МГУ.015.5 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.24, МГУ, биологический факультет, кафедра биофизики, аудитория «Новая».

E-mail: fursova@biophys.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3625>

Автореферат разослан «___» _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат физико-математических наук

Фурсова П.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

С момента открытия вирусы находятся в центре внимания исследователей как в биологии, так и в медицине. В последнее время достигнуты значительные успехи в изучении структуры и функционирования вирусов, разработке эффективных средств борьбы с предотвращением и распространением вирусных инфекций. Тем не менее, по рекомендациям Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) целый ряд возбудителей вирусной природы остаётся приоритетным для изучения. В список патогенов, способных с высоким риском вызвать эпидемии или пандемии, входят в том числе коронавирусы и flaviviruses. Инфекции, вызываемые рядом коронавирусов, быстро распространяются, плохо поддаются лечению, а при тяжелом течении заболевания приводят к летальному исходу. Так, коронавирусы MERS-CoV, SARS-CoV и SARS-CoV-2 вызвали эпидемии и пандемию в XXI веке. К настоящему времени известно более 70 flaviviruses, многие из которых являются возбудителями опасных заболеваний, среди них быстро распространяющиеся вирус Зика (ZIKV) и вирус денге (DENV).

Синтезированный 150 лет назад, метиленовый синий нашёл широкое применение не только как краситель в промышленности и научных исследованиях, но и в качестве медицинского препарата. Метиленовый синий проявляет антимикробную активность в отношении широкого спектра патогенов, сыграл значительную роль в борьбе с малярией, в настоящее время применяется в качестве антисептика. При возбуждении соответствующими длинами волн метиленовый синий служит фотосенсибилизатором и используется в системе THERAFLEX MB-Plasma для фотодинамического обеззараживания плазмы крови. Наряду с другими оболочечными вирусами, коронавирусы и flaviviruses чувствительны к обработке метиленовым синим, причём как при фотоактивации, так и без дополнительного воздействия светом, однако, природа этих эффектов изучена недостаточно.

Современное развитие вычислительных мощностей позволяет создавать молекулярные модели не только отдельных молекулярных компонентов вирусных частиц, но и крупномасштабные модели, например, целых оболочек вирионов. Так, в 2023 году была создана крупнозернистая модель оболочки вириона SARS-CoV-2. Подобные модели, несомненно, позволяют получить лучшее представление о строении и

функционировании вирусов. В то же время, несмотря на очевидные преимущества таких моделей, они почти не применяются для исследования взаимодействий различных соединений с вирусными оболочками и поиска потенциальных противовирусных препаратов.

Степень разработанности проблемы

Действие метиленового синего на коронавирусы вне клеток экспериментально показано в целом ряде работ. Морфологически это проявляется в лизисе мембранных оболочки вирусов и отрыве S белков. В культурах клеток метиленовый синий значительно снижает титры коронавирусов, а также вируса Зика и, в меньшей степени, вируса денге, как при предварительной обработке, так и после заражения клеток. Облучение видимым светом в процессе фотодинамической инактивации усиливает вирулицидные свойства метиленового синего в отношении коронавирусов и флавивирусов, хотя эти свойства в определённой степени проявляются и в отсутствие освещения. Однако, несмотря на доказанную эффективность метиленового синего в отношении оболочечных вирусов, молекулярные аспекты его взаимодействия с вирусными частицами остаются неясными.

Методы броуновской динамики позволяют моделировать процессы диффузационного связывания биомолекул и их электростатических взаимодействий. Применение многомасштабных подходов, например, через объединение методов молекулярной и броуновской динамики, позволяет получить высокую детализацию процессов на больших масштабах наблюдаемых явлений. Однако, такие подходы редко применяются для изучения механизмов действия биологически активных молекул.

В настоящей работе подходы молекулярной и броуновской динамики были объединены для изучения молекулярных механизмов действия метиленового синего на вирусы. Использование крупнозернистых и полноатомных моделей целых оболочек коронавируса и флавивирусов позволило наиболее полно изучить процессы взаимодействия с ними метиленового синего. Применение метода броуновской динамики помогло проследить взаимодействие метиленового синего с вирусной оболочкой на начальных стадиях сближения, а применение молекулярной динамики – определить роль ионных, ароматических и других взаимодействий в связывании метиленового синего с вирусными белками.

Цели и задачи

Цель работы заключается в выявлении методами компьютерного моделирования молекулярных механизмов взаимодействия метиленового синего с коронавирусами и флавивирусами, лежащих в основе его ингибирующего действия на функциональную активность белков вирусной оболочки.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Создать молекулярно-динамические модели структур оболочек коронавирусов и флавивирусов, а также молекулы метиленового синего, и рассчитать их электростатический потенциал;
2. Найти области связывания метиленового синего с оболочками коронавируса и флавивирусов методами броуновской динамики;
3. Получить количественные характеристики связывания метиленового синего с S белками оболочек коронавируса, участвующих в стадиях связывания к клеточными рецепторами;
4. Получить энергетические характеристики процессов прохождения метиленового синего через мембрану коронавируса без и со встроенным в нее виропорином методом полноатомной молекулярной динамики с отбором зонтичных проб;
5. Определить типы связей, образующимся при взаимодействии метиленового синего с аминокислотными остатками виропорина коронавируса;
6. Выявить электростатические взаимодействия метиленового синего с аминокислотными остатками белка оболочки флавивирусов, лежащие в основе ингибирующего действия метиленового синего на процессы связывания вирусов с клетками и слияния мембран.

Научная новизна

В компьютерной модели удалось воспроизвести реализацию процесса взаимодействия метиленового синего с белками оболочки коронавирусов и флавивирусов и определить ключевые аминокислоты, контакты с которыми могут приводить к ингибированию функциональной активности вирусных структур. Методом броуновской динамики выявлены сайты связывания молекул метиленового синего на таких структурных компонентах оболочки коронавирусов, как S, E белки и отрицательно

заряженные липиды мембранные оболочки. Применение метода броуновской динамики с использованием созданных моделей целых белковых оболочек вируса Зика и вируса денге позволило детально изучить взаимодействие с ними метиленового синего и выявить особенности молекулярного строения белков оболочки, существенные для проявления различий в связывании метиленового синего между этими двумя вирусами.

Получены энергетические характеристики взаимодействия метиленового синего с конкретными структурными элементами вирусной оболочки. Оценка энергии прохождения метиленового синего через ERGIC-подобную мембрану без и со встроенным в неё каналом виропорина SARS-CoV-2 позволила выявить высокий энергетический барьер на пути проникновения метиленового синего через мембрану. При наличии в мембране виропоринов найдена предпочтительная локализация молекул метиленового синего в центре канала, которая обеспечивается π - π взаимодействиями с остатками фенилаланина.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость работы заключается в разработке подхода к анализу взаимодействий заряженных молекул с оболочечными вирусами с использованием молекулярных пространственных моделей целых вирионов. Определены молекулярно-динамические характеристики процесса взаимодействия метиленового синего с вирусной частицей, что является необходимым для более полного понимания природы его противовирусной активности.

Практическая значимость работы заключается в том, что разработанный подход может быть применен при разработке соединений с противовирусными свойствами для оценки активности и определения механизмов действия на оболочечные вирусы. Выявленные ключевые взаимодействия молекул метиленового синего с аминокислотными остатками виропорина могут помочь в разработке противовирусных соединений, нацеленных на эти вирусные канальные белки.

Методология и методы исследования

В работе использованы крупнозернистая молекулярная модель оболочки вируса SARS-CoV-2, крупнозернистые и полноатомные модели компонентов вириона и молекулы метиленового синего. Работа выполнена с использованием компьютерного

моделирования, включая проведение расчетов полноатомной и крупнозернистой молекулярной динамики, зонтичной выборки в рамках неравновесной молекулярной динамики, а также броуновской динамики.

Объект и предмет исследования

Объектами исследования являются молекулярные модели метиленового синего, оболочки коронавирусного вириона и белки вирусной оболочки и ее мембрана, а также модели белковых оболочек флавивирусов. Предметом исследования являются межмолекулярные взаимодействия метиленового синего с компонентами оболочки вируса.

Положения, выносимые на защиту

1. Использование молекулярных моделей оболочек вирусов в сочетании с методом броуновской динамики позволяет выявлять области связывания заряженных молекул противовирусных соединений и анализировать их контакты с функционально значимыми компонентами.
2. Различия в распределении электростатического потенциала вокруг белков оболочек флавивирусов определяет доступность их функциональных петель для электростатических взаимодействий с противовирусными соединениями.
3. Близкое пространственное расположение аминокислотных остатков со сходными физико-химическими свойствами в пентамерном виропорине коронавируса обуславливает образование многочисленных ионных и ароматических нековалентных связей с органическими катионами, что может делать виропорин чувствительной мишенью для этого типа соединений.

Степень достоверности и апробации результатов

Достоверность результатов выполненной работы подтверждена публикацией 5 статей в рецензируемых журналах и сборниках, индексируемых в базе ядра Российского индекса научного цитирования "eLibrary Science Index".

Материалы работы были представлены на семинарах сектора информатики и биофизики сложных систем кафедры биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, семинарах лаборатории «ИИ в биоинформатике и медицине»

Института перспективных исследований проблем искусственного интеллекта МГУ имени М.В. Ломоносова, а также на следующих международных и российских конференциях: «II Международная научно-практическая конференция «Математическое моделирование систем и процессов», Псков, Россия, 2023; «Математика. Компьютер. Образование», Пущино, Россия, 2024; «Ломоносов-2025», Москва, Россия, 2025.

В работе были использованы современные методы компьютерного моделирования и методики выполнения вычислительных экспериментов, соответствующие поставленным задачам.

Личный вклад автора заключается в анализе литературных данных, создании полноатомных мембранных систем со встроенным виропоринами, проведении и молекулярно-динамических расчетов и расчетов броуновской динамике, в анализе результатов, включая анализ контактов метиленового синего в молекулярными структурами оболочки коронавируса, проведение кластерного анализа, анализа взаимодействий молекулы метиленового синего с виропорином, интерпретации результатов, подготовке публикаций и докладов по теме диссертации.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 130 страницах машинописного текста и включает введение, литературный обзор, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список сокращений и список литературных источников, состоящий из 209 наименований. Работа содержит 27 рисунков и 8 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** дано обоснование актуальности исследования, проводимого в рамках данной диссертационной работы, формулируется цель, ставятся задачи работы, излагается научная новизна, теоретическая и практическая значимость представленного исследования, а также приводятся положения, выносимые на защиту.

В **первой главе** приведен обзор научной литературы по проблематике диссертационного исследования. Обсуждаются методы молекулярного моделирования в контексте поиска новых лекарственных препаратов, физико-химические и противовирусные свойства метиленового синего с акцентом на его активность в

отношении коронавирусов и flaviviruses. Приводятся современные сведения о строении вирионов коронавирусов и flaviviruses, их жизненных циклов, а также строение и функционирование виропоринов коронавирусов.

Вторая глава посвящена описанию используемых в работе пространственных структур объектов исследования и методов молекулярного моделирования, а также подробному описанию протоколов вычислительных экспериментов.

Для работы использовалась как крупнозернистая, так и полноатомная модели молекулы метиленового синего. Крупнозернистая модель состояла из восьми зёрен, а единичный положительный заряд молекулы был распределен на двух боковых диметиламиновых группах. Полноатомная модель была получена с помощью веб-сервиса ATB. Модель молекулы фталоцианина цинка ($Zn\text{-PcChol}^{8+}$) была получена на кафедре биофизики МГУ имени М.В. Ломоносова и предоставлена ее авторами.

Используемая в работе крупнозернистая модель оболочки коронавируса SARS-CoV-2 построена с использованием силового поля Martini 3 и включает в себя все компоненты внешней оболочки вириона: S белки, M белки и E белки. M белок как основной белок оболочки представлен в 1003 копиях, S белок – в 25 копиях, E белок – в 2 копиях. В состав мембраны были включены нейтральные и отрицательно заряженные липиды. Крупнозернистые модели структур S белков трех коронавирусов человека (MERS-CoV, SARS-CoV, SARS-CoV-2) в силовом поле Martini3, получены с использованием программы Martinize2 (<http://cgmartini.nl>). Эти структуры использованы в предварительных исследованиях, в которых изучалась возможность изменения параметров броуновской динамики и влияние изменения параметров на результаты моделирования.

Модель пентамера E белка, использованная в работе, получена путем моделирования по гомологии. Модельные системы мембранные вириона без и со встроенным в нее виропорина были получены в веб-сервисе CHARMM-GUI.

Для изучения взаимодействия молекул метиленового синего с компонентами оболочки вириона использовались методы броуновской динамики, а также метод равновесной молекулярной динамики и метод зонтичной выборки.

Отдельный **Раздел 2.5** во второй главе посвящён подбору параметров моделирования броуновской динамики. Цель данной части работы заключается в уменьшении занятой оперативной памяти компьютера при вычислениях симуляций броуновской динамики.

Эта необходимость обусловлена размерами моделей, используемых в работе, а именно модели оболочки коронавируса, состоящей из порядка миллиона крупнозернистых частиц, а требуемый объем оперативной памяти компьютера превышает 150 ГБ. Для этой задачи была проведена серия расчётов с использованием крупнозернистых моделей S белков коронавирусов MERS-CoV, SARS-CoV и SARS-CoV-2 и молекулы фталоцианина цинка ($Zn\text{-PcChol}^{8+}$). В качестве параметра выступал шаг сетки для расчета электростатического потенциала, который принимал значения 1 или 2 Å. Увеличение шага в два раза позволило уменьшить занятую оперативную память примерно в восемь раз без потери данных и искажения результатов вычислительных экспериментов.

В третьей главе описываются результаты вычислительных экспериментов, направленных на изучение взаимодействия молекул метиленового синего с молекулярными компонентами оболочки коронавируса SARS-CoV-2. Глава включает в себя три раздела.

В разделе 3.1. представлены результаты расчета электростатического потенциала на оболочке коронавируса (Рисунок 1Б). Оно имеет заметную гетерогенность с областями как положительного, так и отрицательного потенциала. Далее описываются результаты расчета броуновской динамики, в результате которых было получено 33000 диффузионно-столкновительных комплексов молекулы метиленового синего с компонентами оболочки с энергией электростатического притяжения более 2 кТ. Положение молекул метиленового синего в этих комплексах визуализировано на рисунке 1. На поверхности оболочки существуют как области с высокой способностью связывания молекул метиленового синего, так и обширные области, где молекулы вообще не связываются.

Было подсчитано количество событий взаимодействия молекулы метиленового синего с каждым из компонентов оболочки коронавируса (Таблица 1). Считалось, что контакт имеет место быть если какая-либо КЗ-частица молекулы метиленового синего приближалась к любой КЗ-частице оболочки на расстоянии 0,6 нм. В случае одновременного контакта молекулы метиленового синего с несколькими компонентами оболочки это событие было подсчитано для каждого типа вовлеченного компонента. В результате сумма отношений событий превысила 100%. В целом молекулы метиленового синего взаимодействовали с белками оболочки коронавируса в 64% случаев, а с липидами в 43% случаев.

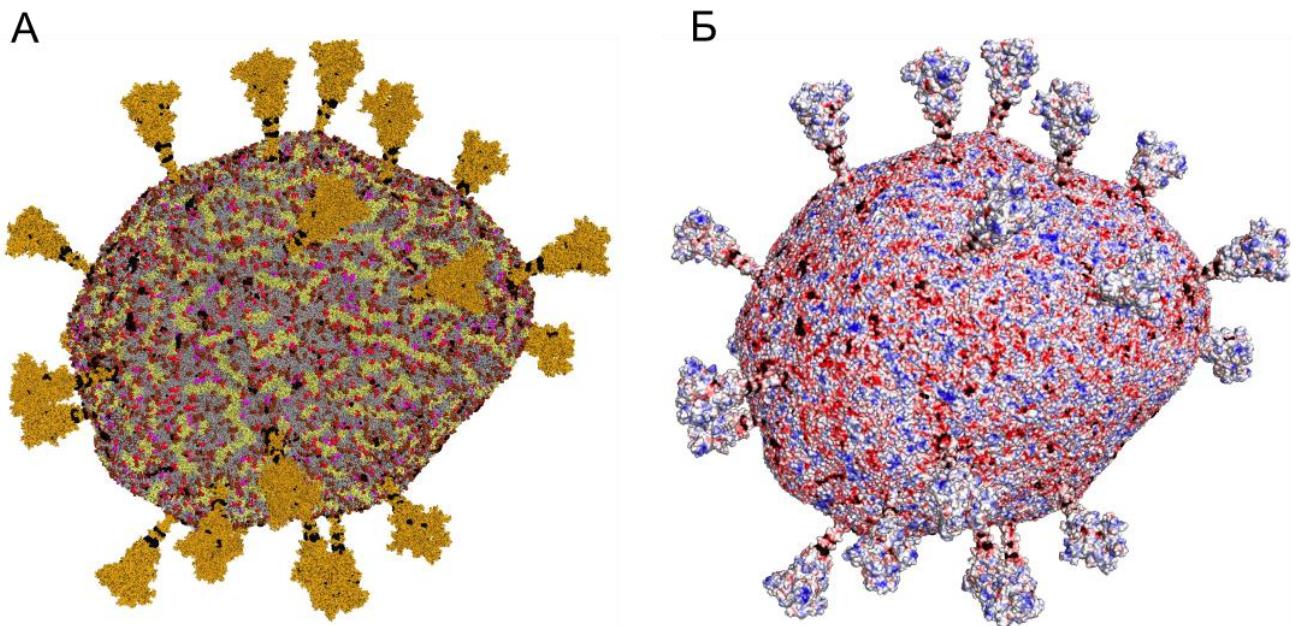


Рисунок 1. Диффузионно-столкновительные комплексы метиленового синего и вирусной оболочки с энергией электростатического притяжения более 2 кТ.

(А) Поверхность модели оболочки вириона, окрашенная в соответствии с типами компонентов оболочки: нейтральные липиды показаны серым цветом; отрицательно заряженные липиды окрашены в разные оттенки красного (молекулы POPI — в коричневый; POPS — в пурпурный; CDL2 — в красный); преобладающие белки окрашены в разные оттенки желтого (белки S — в охристый, белки M — бледно-желтый); показанная копия E белка окрашена в белый цвет. (Б) Поверхность вириона, окрашенная в соответствии с его электростатическим потенциалом от -50 мВ (красный) до $+50$ мВ (синий). Центры масс метиленового синего визуализируются в виде маленьких черных сфер.

Почти 60% всех событий связывания произошло с S белками, в то время как с M белками связывания практически не наблюдалось. При этом, на «ноге» S белка обнаружена ранее не идентифицируемая область связывания молекул метиленового синего, расположенная у основания шипа на HR2 домене в области его перехода в трансмембранный домен (Рисунок 2). Мембрана, окружающая эту область богата отрицательно заряженными липидами, которые создают область отрицательного потенциала, достаточную для связывания молекул метиленового синего.

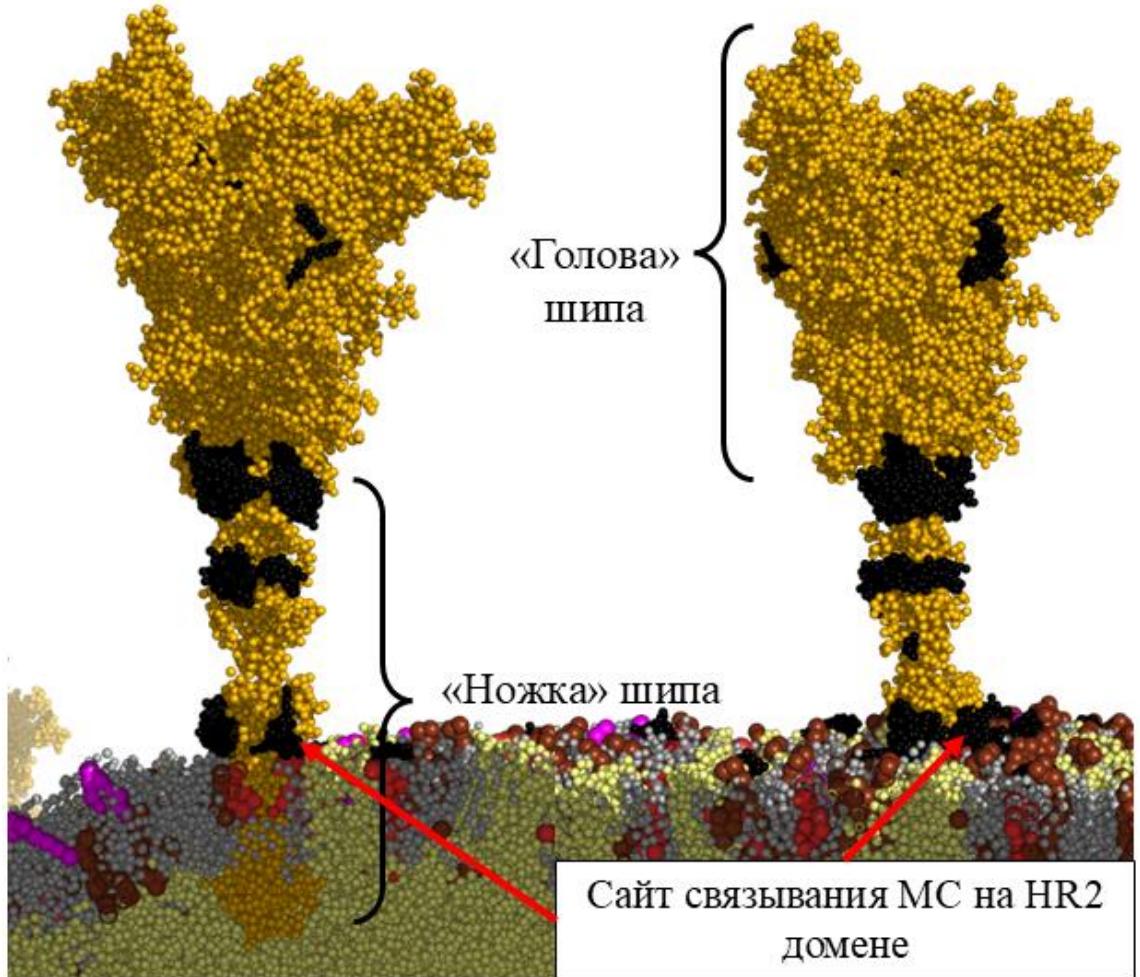


Рисунок 2. Связывание молекул МС на поверхности S белка. Структура S белка показана охристыми сферами, центры масс молекул МС показаны черными сферами, мембрана окрашена в соответствии с Рисунком 3.1.2. Красными стрелками указаны области связывания молекул МС на HR2 домене S белка.

Другим компонентом оболочки коронавируса, с которым метиленовый синий часто образует контакты благодаря электростатическим взаимодействиям, является Е белок. В мембране вириона он представлен в виде двух гомопентамеров, или виропоринов, которые выполняют роль ионных каналов. Виропорины окружены отрицательно заряженными липидами, что увеличивает их способность связывать молекулы метиленового синего.

Таблица 1. Контакты молекулы метиленового синего (МС) с компонентами оболочки SARS-CoV-2 с энергией электростатического притяжения более 2 кТ.

Компоненты вирусной оболочки		Доля МС, %	
Белки	S	59,5	
	M	3,2	
	E	2,0	
Липиды	POPI	17,7	
	CDL2	28,2	
	POPS	4,3	
	POPC	31,0	
	POPE	15,2	
	CHOL	0,3	

В разделе **3.2.** описываются результаты полноатомного моделирования зоничной выборки процесса транслокации молекулы метиленового синего через мембрану оболочки коронавируса. В результате расчетов получен профиль потенциала средней силы, описывающий изменение свободной энергии этого процесса вдоль нормали к поверхности мембранны. Профиль свободной энергии прохождения молекулы метиленового синего через мембрану имеет симметричный характер. На пути реакции существует энергетический барьер, максимум которого приходится на середину мембранны. В этой области катион метиленового синего окружен гидрофобными липидными хвостами, что обуславливает наличие энергетического барьера. Величина энергетического барьера прохождения молекулы метиленового синего через мембрану составляет +37,8 кДж/моль (15,2 кТ). Полученные данные свидетельствуют о том, что действие метиленового синего при фотодинамической инактивации вирусов направлено на окисление липидов, с которыми он связывается на поверхности мембранны за счет электростатического притяжения, однако проходить через мембрану он не может.

Раздел **3.3.** включает в себя сравнение известных моделей виропорина коронавируса SARS-CoV-2 и результаты равновесной молекулярной динамики этих моделей внутри липидного бислоя. Далее описывается профиль потенциала средней силы прохождения молекулы метиленового синего через канал виропорина коронавируса, полученный

методом зонтичной выборки, а также его взаимодействия с аминокислотными остатками внутри канала. Методом зонтичного отбора был получен профиль потенциала средней силы прохождения молекулы метиленового синего через канал виропорина коронавируса. На пути проникновения молекулы метиленового синего через пору пентамера Е белка критических энергетических барьеров не выявлено. Наблюдались пять локальных минимумов энергии, самый глубокий из которых соответствовал положению **3**, когда метиленовый синий находился в центре белкового канала, и составил $-13,56 \text{ кДж/моль}$ ($-5,50 \text{ кT}$) (Рисунок 3).

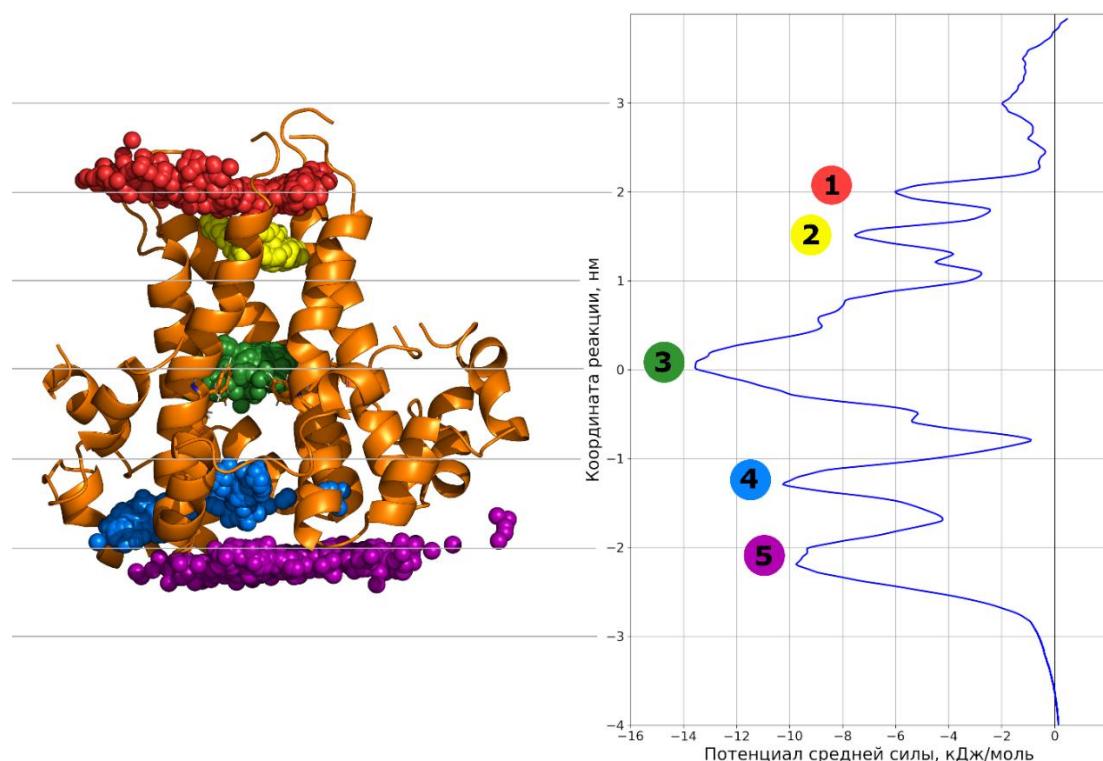


Рисунок 3. Потенциал средней силы взаимодействия метиленового синего с аминокислотными остатками, формирующими канал пентамера Е белка SARS-CoV-2. Слева показан Е белок (оранжевый цвет) и центры масс молекул метиленового синего, положения которых соответствуют минимумам потенциала средней силы на правой панели.

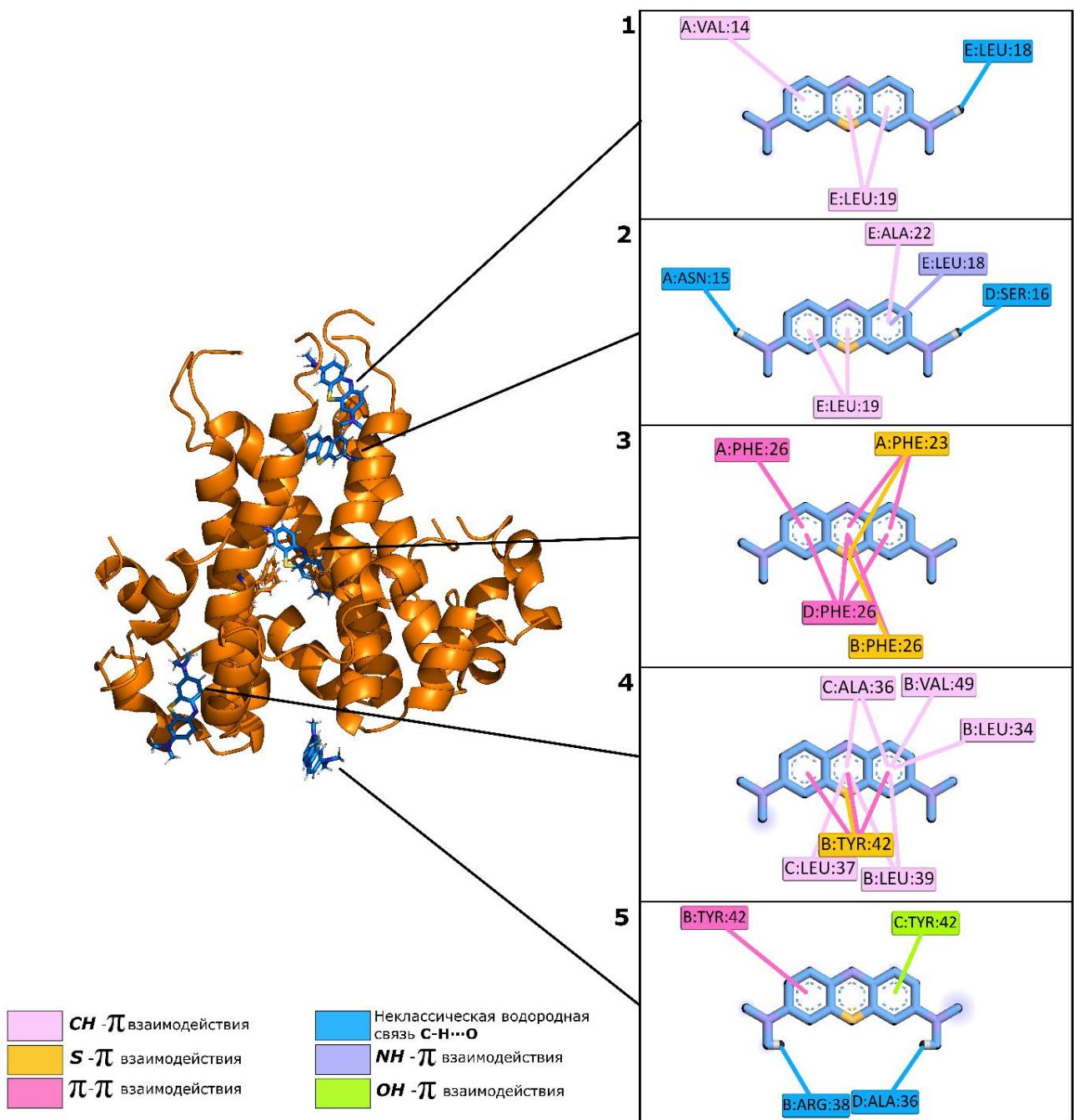


Рисунок 4. Положения метиленового синего (МС), соответствующие минимумам потенциала средней силы (ПСС). МС представлен синим цветом, пентамерный Е белок представлен оранжевым цветом, его конформация соответствует состоянию белка после уравновешивания. Для положений в каждом минимуме представлены диаграммы взаимодействий молекулы МС с аминокислотными остатками белка. Аминокислотный остаток имеет следующее обозначение: цепь, которой он принадлежит, трехбуквенное обозначение типа аминокислоты и номер остатка. Положения МС в канале виропорина пронумерованы в соответствии с рисунком 3.

Положения молекул метиленового синего из траекторий зонтичной выборки, соответствующие минимумах энергии на профиле потенциала средней силы были отобраны для кластерного анализа. Для типичных конформаций молекул были проанализированы взаимодействия метиленового синего с аминокислотными остатками канала пентамера E белка. Всего было выявлено шесть типов нековалентных взаимодействий (Рисунок 4), в основном обусловленных наличием системы ароматических колец в структуре метиленового синего. Так, наблюдаемые π - π стэкинг взаимодействия обусловлены перекрыванием p-орбиталей в π -сопряженных системах метиленового синего и остатков ароматических аминокислот тирозина и фенилаланина. При CH- π взаимодействиях происходит взаимодействие π -электронного облака ароматической системы метиленового синего и электронного облака алкильных групп аланина, валина или лейцина. Другие типы π -взаимодействий включали S- π , NH- π и OH- π взаимодействия. Кроме этого, существенную долю контактов между молекулами метиленового синего и аминокислотными остатками белка составляли неклассические водородные связи, образующиеся между водородами диметиламиновых групп и атомами кислорода белка. Такие связи гораздо слабее классических водородных связей, тем не менее их энергия находится в диапазоне 2–10 кДж/моль.

Метод зонтичного отбора проб позволил показать, что что следующим этапом после первоначального электростатического контакта молекулы метиленового синего с отрицательно заряженными остатками глутаминовой кислоты N-конца E белков SARS-CoV-2, при дальнейшем погружении в канал виропорина молекулы метиленового синего вступают в множественные π -взаимодействия.

Глава 4 описывает процесс создания моделей белковых оболочек вируса Зика (ZIKV) и вируса денге (DENV), а также результаты броуновской динамики взаимодействия молекул метиленового синего с полученными белковыми оболочками flaviviruses. Приведены результаты анализа контактов метиленового синего с аминокислотными остатками белков оболочки, которые вовлечены в ранние стадии инфицирования клеток. Выявлены контакты, которые могут определять известную противовирусную активность этого соединения.

Известно, что все патогенные flaviviruses используют гликозаминогликаны (ГАГ), присутствующие на поверхности клетки-хозяина, в качестве факторов прикрепления. В E белке оболочки flaviviruses обычно выделяют три домена (DI, DII, DIII). ГАГ-

связывающая петля соответствует аминокислотным остаткам LYS290–LYS316 (ZIKV) и LYS282–LYS308 (DENV) и находится на границе доменов DI и DIII. Эта область богата положительно заряженными остатками лизинов, что, по всей видимости, способствует электростатическим взаимодействиям ГАГ-связывающей петли с отрицательно заряженными сульфатированными ГАГ. В домене DI находится участок полипептидной цепи, который называют «гликановая петля». Этот участок включает аминокислотные остатки HIS144–ASN163 у вируса Зика и HIS144–GLN156 у вируса денге. Остатки ASP154 и ASP153 представляют сайт гликозилирования у вирусов Зика и денге, соответственно.

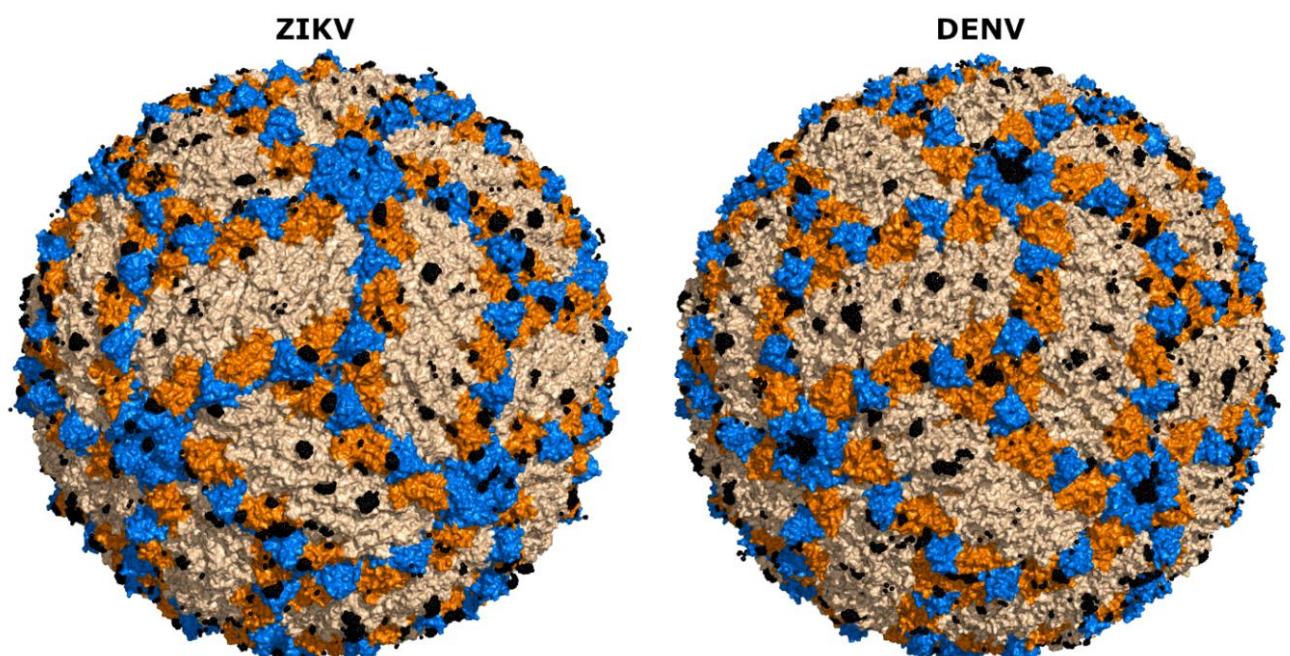


Рисунок 5. Электростатические комплексы молекул метиленового синего с белковой оболочкой вируса Зика (слева) и вируса денге (справа). Центры масс молекул метиленового синего представлены черными сферами. Поверхность белковой оболочки вирусов окрашена в соответствии с доменной организацией Е белка (домен I – оранжевый, домен II – бежевый, домен III – синий).

В диссертационной работе были проведены расчеты броуновской динамики взаимодействия молекул метиленового синего с белковой оболочкой flavивирусов ZIKV и DENV и были получены, соответственно, 38500 и 29000 электростатических комплексов с энергией притяжения 3 кТ. Места электростатических контактов молекул метиленового синего на поверхности оболочки вирионов образуют обособленные

области (Рисунок 5). Наиболее характерные области притяжения молекул метиленового синего располагаются у вируса Зика на границе доменов DI и DIII в местах контактов трех мономеров Е белка (на границе синих и оранжевых областей), а в случае вируса денге – местах схождения трех мономеров Е белка (оранжевые области) и пяти мономеров Е белка (синие области). Также на поверхности обоих вирусов присутствуют области контактов с молекулами метиленового синего на домене DII.

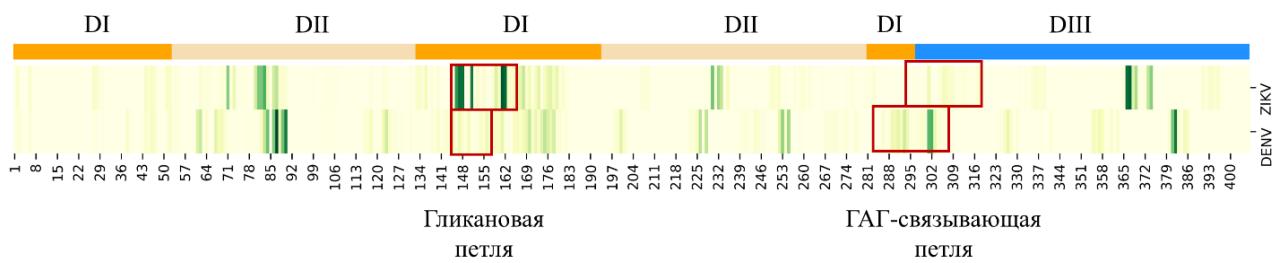


Рисунок 6. Аминокислотные остатки в первичных последовательностях вируса Зика (ZIKV) и вируса денге (DENV), окрашенные от светло-желтого до темно-зеленого в зависимости от относительного количества контактов с метиленовым синим. Полоса сверху показывает доменную организацию Е белка (в соответствии с окраской на рис. 5). Красными рамками обозначены участки Е белка, соответствующие гликановой петле (остатки 144–163 для вируса Зика и 144–156 для вируса денге), и участки, соответствующие ГАГ-связывающей петле (остатки 290–316 для вируса Зика и 282–308 для вируса денге).

Результаты анализа контактов молекул метиленового синего с аминокислотными остатками Е белков вирусов Зика и денге приведены на Рисунке 6. Видно, что в области гликановой петли домена DI Е белка вируса Зика присутствуют многочисленные контакты метиленового синего с шестью аминокислотными остатками, а именно SER146, GLN147, HIS148, MET151, ASP161, GLU162. Также обращают на себя внимание многочисленные контакты MC с расположенными в домене DIII остатками THR366 и GLU367, и с участками GLU71–GLU87 и GLU230–THR233 в домене DII. Заметим, что на участке, содержащем ГАГ-петлю и ответственном за первичное узнавание клетки- хозяина (аминокислотные остатки LYS290–LYS316), контакты с метиленовым синим малочисленны.

Вторичная структура Е белка вируса Зика организована так, что гликановая петля, содержащая отрицательно заряженные аминокислотными остатки ASP155, GLU159,

ASP161 и GLU162, дополнительно окружена отрицательно заряженными остатками ASP42, GLU44, GLU329, ASP336, GLU367, GLU370, GLU377 (Рисунок 7). Все перечисленные аминокислотные остатки глутаминовой и аспарагиновой кислот формируют обширную область отрицательного потенциала в области гликановой петли, электростатически притягивающую положительно заряженные молекулы метиленового синего.

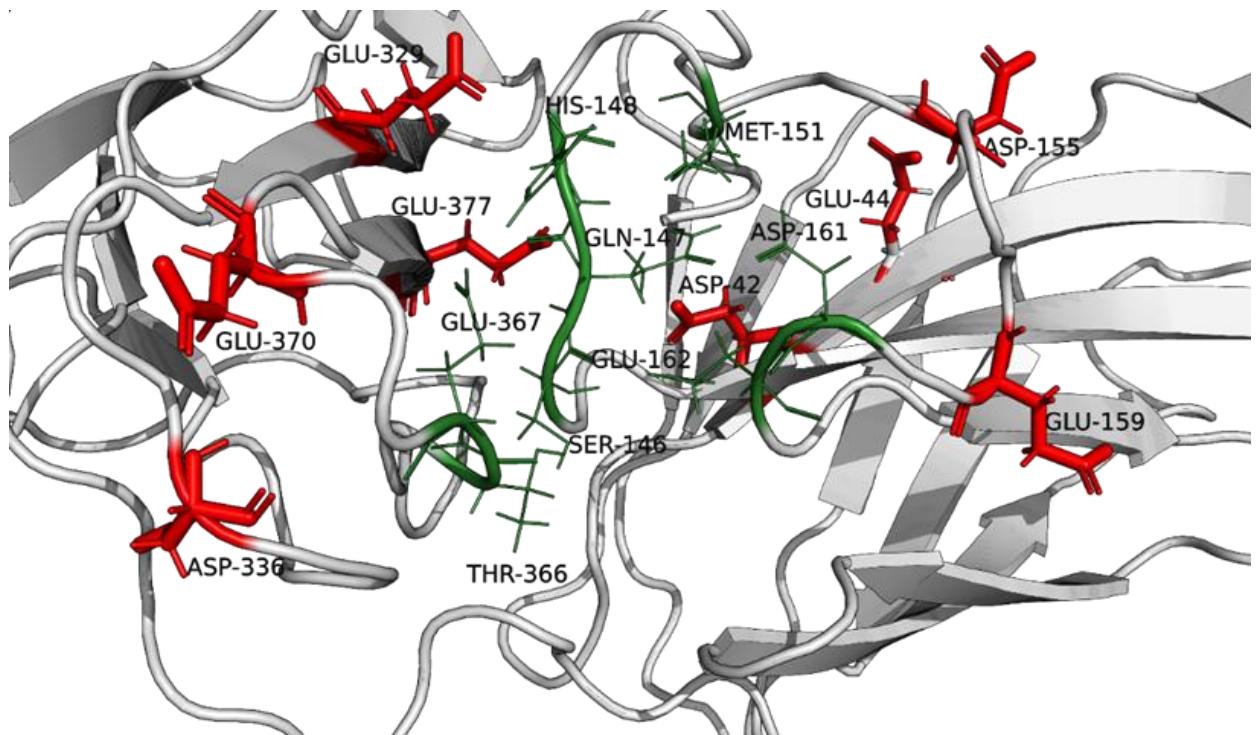


Рисунок 7. Участок Е белка вируса Зика, содержащий гликановую петлю.

Аминокислотные остатки, имеющие наибольшее количество контактов с метиленовым синим, показаны зеленым цветом (SER146, GLN147, HIS148, MET151, ASP161, GLU162, THR366, GLU367), окружающие их отрицательно заряженные аминокислотные остатки – красным цветом (ASP42, GLU44, ASP155, GLU159, GLU329, ASP336, GLU370, GLU377).

В отличии от Е белка вируса Зика, молекулы метиленового синего имеют значительное количество контактов с аминокислотными остатками, входящими в ГАГ-связывающую петлю Е белка вируса денге. Аминокислотные остатки THR301 и ASN302, входящие в эту петлю, локализованы совместно с остатками GLY381 и ASP382. Большое количество контактов молекул метиленового синего в этой области обеспечивается отрицательно заряженными остатками GLU323, GLU327, ASP328, GLU360 и GLY381 (Рисунок 8).

Метиленовый синий обладает способностью электростатически взаимодействовать с отрицательно заряженными аминокислотными остатками в областях гликановой петли Е белка вируса Зика и ГАГ-связывающей петли Е белка вируса денге. Взаимодействие молекул метиленового синего с аминокислотными остатками Е белков, которые вовлечены в ранние стадии инфицирования клеток, может определять его противовирусную активность, которая экспериментально показана в отношении различных оболочечных вирусов, в том числе flaviviruses.

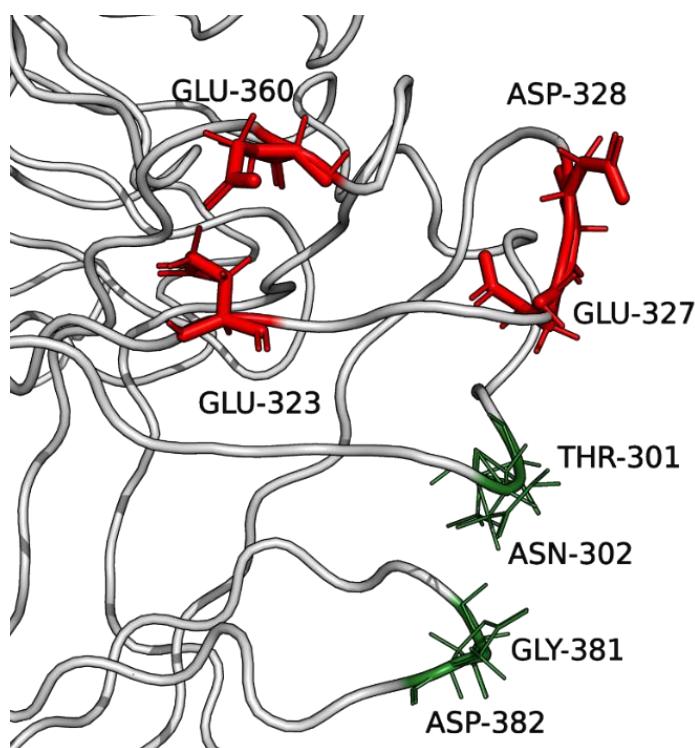


Рисунок 8. Участок домена DIII Е белка вируса денге, содержащий ГАГ-связывающую петлю. Аминокислотные остатки, имеющие наибольшее количество контактов с метиленовым синим, показаны зеленым цветом (THR301, ASN302, GLY381, ASP382), окружающие их отрицательно заряженные аминокислотные остатки – красным цветом (GLU323, GLU327, ASP328, GLU360).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе были идентифицированы вирусные структуры, которые могут выступать мишениями противовирусных препаратов, а также предложены антимикробные механизмы действия молекул метиленового синего на эти структуры, которые могут помочь в разработке новых малых молекул с противовирусными свойствами.

В результате проведения вычислительных экспериментов по броуновской динамике и расчета поля электростатического потенциала оболочек вирусов были выявлены основные молекулярные структуры на поверхности оболочки вириона SARS-CoV-2, которые способны связывать молекулы метиленового синего. К таким структурам относятся S белки, отрицательно заряженные липиды мембранные оболочки и виропорины. Благодаря использованию модели целого вириона нами был найден дополнительный сайт связывания молекул метиленового синего на HR2 домене S белка, расположенный возле трансмембранных доменов около поверхности мембранных, который не был идентифицирован ранее.

Кроме того, было идентифицировано значительное связывание молекул метиленового синего с виропоринами. Виропорины являются ключевыми белками, высоко экспрессирующими внутри клетки и участвующими в сборке новых вирусных частиц на мембранах ERGIC. Благодаря важности их участия в этом процессе их рассматривают в качестве потенциальных мишеней для противовирусных препаратов. С применением метода зонтичного отбора проб был получен профиль потенциала средней силы прохождения молекул метиленового синего через пору виропорина. Оценка минимальной энергии взаимодействия метиленового синего с аминокислотными остатками внутри канала показала значение энергии равное $-13,56$ кДж/моль. Было показано, что основной вклад в эту энергию вносят различного рода π взаимодействия с остатками фенилаланинов, наиболее значимые из которых $\pi\text{-}\pi$ взаимодействия. Выявленные ключевые взаимодействия метиленового синего с аминокислотными остатками E белка могут помочь в создании новых противовирусных препаратов, нацеленных на виропорины.

На основании полученных результатов были выдвинуты возможные механизмы действия метиленового синего как при фотодинамической инактивации оболочечных вирусов, так и при его действии в темноте. Наличие сайта связывания метиленового синего на HR2 домене S белка может объяснить полную потерю шипов у вириона при

фотодинамической инактивации коронавирусов. Опираясь на то, что молекулы метиленового синего могут проходить внутрь клетки, было выдвинуто предположение о его возможном ингибировании стадии формирования новых вирионов на мембранах ERGIC через блокирование каналов виропоринов. Благодаря рассчитанным профилям свободной энергии прохождения молекулы метиленового синего через мембрану и через канал виропорина можно предположить, что виропорины облегчают прохождение молекул метиленового синего внутрь вириона, где он опосредует фотодинамическое разрушение вирусной РНК.

Метод броуновской динамики позволяет проанализировать начальные стадии взаимодействия заряженных молекул антимикробных соединений со структурными компонентами целых вирусных оболочек и выявить области электростатических контактов с разрешением конкретных аминокислотных остатков, участвующих в таких взаимодействиях. Применение метода броуновской динамики к изучению взаимодействия молекул метиленового синего с белковыми оболочками flaviviruses позволило выявить особенности взаимодействия этих молекул с оболочками вируса Зика и вируса денге, и теоретически обосновать известное ингибирующие действие метиленового синего на первые стадии жизненного цикла оболочечных вирусов, включающие первичное узнавание поверхности клетки-хозяина и слияние мембран. Полученные результаты указывают на перспективу дальнейших экспериментальных исследований потенциала метиленового синего в качестве противовирусного препарата.

Проведение вычислительных экспериментов с использованием молекулярных пространственных моделей масштаба целого вириона представляется эффективным подходом при поиске молекул с противовирусными свойствами, а также при поиске мишеней, на которые могут быть нацелены эти молекулы.

На основании проведенных исследований и полученных результатов можно сделать следующие **выводы**:

1. Электростатическое потенциальное поле оболочек коронавирусов и flaviviruses сильно неоднородно и состоит из чередующихся областей положительного и отрицательного заряда на белках и липидах мембранных оболочки вирионов.
2. Методом броуновской динамики найдены обособленные области электростатических контактов метиленового синего с S белками, E белками и

отрицательно заряженными липидами коронавируса, а также Е белками флавивирусов.

3. На S белки оболочки коронавируса, которые обеспечивают связывание вируса с клеточными рецепторами и слияние мембран, приходится более половины электростатических контактов с молекулами метиленового синего. Основные из них расположены между HR1 и HR2 доменами в месте сочленения «головы» и «ножки» шипа и на HR2 домене на границе с трансмембранным доменом.
4. В белке оболочки вируса Зика область отрицательного потенциала, окружающая гликановую петлю, которая участвует в процессе слияния мембран при заражении вирусом клеток, эффективно притягивает молекулы метиленового синего. Гликановая петля белка оболочки вируса денге закрыта от электростатических взаимодействий с молекулами метиленового синего областью положительного потенциала.
5. Метиленовый синий образует значительное количество контактов с петлей белка оболочки вируса денге, опосредующей первичное узнавание гликозамингликанов при связывании вирусов с клетками.
6. На пути проникновения положительно заряженных молекул метиленового синего через мембрану коронавируса наблюдается высокий энергетический барьер +37,8 кДж/моль в середине фосфолипидного бислоя.
7. При транслокации метиленового синего через канал виропорина коронавируса наблюдается пять локальных минимумов энергии, наименьший из которых находится в центре канала и составляет –13,6 кДж/моль. Отрицательно заряженные аминокислотные остатки глутаминовой кислоты Е белка обеспечивают электростатическое притяжение молекул метиленового синего ко входу в пентамерный канал - виропорин. В канале виропорина глобальный минимум энергии достигается за счет многочисленных π - π взаимодействий метиленового синего с 15 остатками фенилаланина.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

Основные публикации Васюченко Екатерины Павловны по теме диссертационной работы в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базе ядра Российского индекса научного цитирования "eLibrary Science Index", рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.2. Биофизика (биологические науки) (в скобках приведен импакт-фактор журнала, объем публикации в печатных листах/вклад автора в печатных листах):

1. **Е. П. Васюченко**, М. Г. Страховская, И. Б. Коваленко, П. В. Фурсова, А. Б. Рубин. Особенности электростатического взаимодействия метиленового синего с белковой оболочкой флавивирусов //Математическая биология и биоинформатика. – 2025. – Т. 20. – №2. – С. 532–542. **DOI:** 10.17537/2025.20.532 (Импакт-фактор 0,391 (РИНЦ); 0,7 п.л./0,6 п.л.)
2. **Е. П. Васюченко**, Е. Г. Холина, В. А. Федоров, М. Г. Страховская, И. Б. Коваленко, А. Б. Рубин. Молекулярное моделирование взаимодействия метиленового синего с виропорином коронавируса SARS-CoV-2 //Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. – 2025. – Т. 80. – №2. – С. 96–104. **EDN:** HQMVZK. (Импакт-фактор 0,306 (РИНЦ); 0,8/0,7 п.л.)
3. Kovalenko I., Kholina E., Fedorov V., Khruschev S., **Vasyuchenko E.**, Meerovich G., Strakhovskaya M. Interaction of Methylene Blue with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Envelope Revealed by Molecular Modeling //International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24. – No. 21. – P. 15909. **EDN:** JXMOHE. (Импакт-фактор 4,9 (JIF); 1,3/0,6 п.л.)
4. **Vasyuchenko E. P.**, Fedorov V. A., Kholina E. G., Khruschev S. S., Kovalenko I. B. Strakhovskaya M. G. Calculation of Electrostatic Potential Field of Coronavirus S Proteins for Brownian Dynamics Simulations //Supercomputing Frontiers and Innovations. – 2022. – Vol. 9. – No. 3. – P. 65-71. **EDN:** BZRMHI. (Импакт-фактор 0,178 (SJR); 0,5/0,4 п.л.)
5. **Vasyuchenko E. P.**, Orekhov P. S., Armeev G. A., Bozdaganyan M. E. CPE-DB: An open database of chemical penetration enhancers //Pharmaceutics. – 2021. – Vol. 13. – No. 1. – P. 66. **EDN:** ZBCZPS. (Импакт-фактор 5,5 (JIF); 1/0,4 п.л.)